



この添付文書をよく読んでから使用して下さい。  
また必要な時に読めるように保管して下さい。

研究用試薬

## WAKFlow® HNA-1 タイピング試薬

WAKFlow® HNA-1 タイピング試薬は、\*\*\*HNA-1 (Human Neutrophil Antigen-1)の遺伝子型(HNA-1a (NA-1)、1b (NA-2)および 1c (SH))を決定するための研究用試薬です。本品は DNA タイピング法の 1 つである PCR-SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide probe) 法に基づき、フローサイトメトリーを応用した Luminex 社\*\*\* (http://www.luminexcorp.com/) の xMAP®テクノロジーを用いて HNA-1 遺伝子のタイピングを行うものです。

### 《測定原理》

本製品では、5' 末端ビオチン標識プライマーを用いて目的の遺伝子領域を PCR 法で増幅させます。この増幅 DNA を、蛍光で色分けしたビーズ上のプローブとハイブリダイズさせます。ビオチン標識された増幅 DNA に蛍光標識ストレプトアビジン(SAPE)を結合させた後、ビーズ上の蛍光(SAPE)とビーズの種類を同時に検出・識別します。増幅 DNA が結合したビーズ(プローブ)の種類を判定することで遺伝子型を決定します。

### 《キットの構成》

本製品の構成試薬およびその貯蔵方法は、下記のとおりです。(96 テスト分)

2~8°Cに保存

- ①増幅試薬(HNA-1 専用) ..... 1,969 μL × 1 本
- ②陽性標準液(HNA-1 専用) ..... 20 μL × 1 本
- ③変性液 ..... \*\*1,000 μL × 1 本
- ④ハイブリダイゼーション緩衝液 ..... 2,200 μL × 1 本
- ⑤ビーズミックス(HNA-1 専用) ..... \*330 μL × 1 本
- ⑥SAPE(蛍光ストレプトアビジン) ..... \*\*220 μL × 1 本
- ⑦洗浄液 ..... \*\*45 mL × 1 本
- ・プレートシール ..... 2 枚

\*\*\*注) ⑤ビーズミックス、⑥SAPE は遮光して 2~8°Cに保存して下さい。

### 本製品以外に用意するもの(別途購入)

・AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製)

注) 本製品には PCR に必要な DNA ポリメラーゼは含まれていません。AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製、4311806JP など)を別途購入してください。なお、他の DNA ポリメラーゼでは本製品の性能を保証いたしかねますので使用しないでください。

## 《使用上又は取扱い上の注意》

### 1. 試薬に関する注意事項

- ・本品は研究用試薬です。疾病の治療・診断・予防を目的として使用しないで下さい。
- ・本品の構成試薬は異なる製造番号の製品、あるいは別製品の構成試薬と組み合わせて使用しないで下さい。
- ・使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。

### 2. 使用者の危険防止に関する注意事項

試薬類を飲んだりなめたりしないで下さい。試薬が皮膚に付着したり、目や口に入ったりしないようじゅうぶんに注意して下さい。また、誤って皮膚に付着したり、目や口に入った場合は、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師に相談して下さい。

### 3. 汚染の防止

PCR で増幅した DNA により、次の検体や試薬が汚染されると誤ったタイピング結果を導く原因となります。そのため、以下のような汚染防止策を施して、PCR 前の検体及び試薬の汚染防止にじゅうぶんに注意して下さい。

#### ＜作業の区分けによる汚染防止＞

- ・汚染を物理的に防止するために、PCR の反応前後でエリアを変えて操作を行って下さい。また、使用するピペットおよびチップはそれぞれのエリア専用とし、互いに持ち込まないようにして下さい。
- ・PCR 後の操作はエリア専用の作業着を着用して行って下さい。使用した手袋は使い捨てとし、他の場所に持ち込まないで下さい。
- ・作業終了後は実験台等を 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液(家庭用の塩素系漂白剤を 10 倍に希釈したもの)で拭いて下さい。

#### ＜汚染の除去＞

PCR で増幅した DNA による汚染が疑われた場合には、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で拭いて下さい。

### 4. 廃棄物に関する注意事項

PCR 反応液を扱ったチップ等は 0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液の入った容器に捨て、そのまま密封して廃棄して下さい。検査終了後、使用した PCR 用チューブや 96 ウェル PCR プレートは、オートクレーブしないでそのまま密封して廃棄して下さい。DNA はオートクレーブでは分解されません。エアロゾルを発生して汚染の原因になりますので、オートクレーブは行わないで下さい。

### 5. その他の注意

本製品は改良のため、予告なく仕様を変更することもありますのでご了承下さい。

《貯蔵方法》 《キットの構成》の項に記載

《有効期間》 12 ヶ月(使用期限は外箱に記載)

《包装単位》 96 テスト

### 《問い合わせ先》

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部

〒739-1195 広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624

TEL (0826) 45-4625 FAX (0826) 45-4624

URL: http://www.wakunagahla.jp/

受付時間 9:00~12:00、13:00~17:30 (月~金曜日、但し祝日を除く)

製造販売元  
**湧永製薬株式会社**  
ワクナガ  
広島県安芸高田市甲田町下甲立 1624  
本社: 大阪市淀川区宮原4丁目5-36  
http://www.wakunaga.co.jp/

## 《操作手順》

### 1. 検体(DNA)の調製

検体(DNA)の推奨濃度は 20  $\mu\text{g/mL}$  です。DNA 抽出は、汚染防止のため PCR で増幅した DNA を扱うエリアとは別のエリアで行って下さい。

### 2. PCR

注)以下の操作は汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

- 1) 下記の試薬を混合します。

\*\*\*<PCRミックス>

1 検体あたりの組成	
①増幅試薬	17.9 $\mu\text{L}$
AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製、別途購入)	0.1 $\mu\text{L}$

■ ①増幅試薬(全量 1,969  $\mu\text{L}$ )に対しては、AmpliTaq Gold 11  $\mu\text{L}$  を混合します。

- 2) 1)で混合した\*\*\*PCRミックス:18  $\mu\text{L}$  を添加した PCR 用チューブに、**検体を 2  $\mu\text{L}$**  加えます。
- 3) サーマルサイクラーにセットし、下記の条件で PCR 反応を行います。

PCR 反応条件								
95°C	→	94°C	→	60°C	→	60°C	→	4°C
9 min		30 sec		1 min		10 min		Hold
			↑					
			35 サイクル					

■ この PCR 反応はおよそ 1.8 時間で終了します。

■ この条件は\*\*\*GeneAmp® PCR System 9700 を用いた場合です。他の装置を用いた場合は、アニーリング条件あるいはサイクル数の変更が必要となることがあります。

\*\*\* ■ Gold-96well GeneAmp® PCR System 9700 で行う場合は、「Selection Method Options」画面で「Reaction Volume」を 20  $\mu\text{L}$  に、「Ramp Speed」を Max に設定して実行して下さい。

\*\*\* ■ PCR 終了後、すぐにハイブリダイゼーション以降の操作を行わない場合は、反応液を 4°C に保管して下さい。室温に放置されると、蛍光シグナルが低くなる場合があります。

### 3. ハイブリダイゼーションと検出

#### (1) 準備

- 55°C hold に設定したサーマルサイクラーを用意します。
- \*\*\*Luminex システムを起動し、Luminex XYP を 37°C に設定しておきます。
  - \*\*\* ■ Luminex システムを 4 時間以上放置するとレーザーが消え、ウォームアップに 30 分かかりますので注意して下さい。
- \*\*\*③変性液、④ハイブリダイゼーション溶液、⑦洗浄液を取り出し常温に戻します。
- 以下の操作は、96 ウェル PCR プレートを用いて行います。(96 ウェル PCR プレートを用いると検体数が多い場合でも迅速な処理が可能です。)

#### (2) ハイブリダイゼーションと検出の手順

注)以下の 1)~5)の操作は、汚染防止のため手袋を着用して行って下さい。

\*特に、③変性液はアルカリ性ですので、使用する際は手袋と保護眼鏡を着用し、試薬が皮膚・目・粘膜に触れないように注意して下さい。もし、このようなことが起きた場合は直ちに水でじゅうぶんに洗い流して下さい。また、こぼれた場合は水で希釈してから拭き取って下さい。

- 1) ③変性液:5  $\mu\text{L}$  を分注した 96 ウェル PCR プレートのウェルに、PCR 反応終了後の増幅 DNA:5  $\mu\text{L}$  または、②陽性標準液:5  $\mu\text{L}$  を加え、ボルテックスまたはピペティング(4 回)でよく混合し、\*\*\*常温に 5~10 分間 放置します。
- 2) 下記の試薬を混合します。

<ハイブリミックス>

1 検体あたりの組成	
④ハイブリダイゼーション溶液	20 $\mu\text{L}$
⑤ビーズミックス(HNA-1 専用)	3 $\mu\text{L}$
⑥SAPE(蛍光ストレプトアビジン)	2 $\mu\text{L}$

■ ⑤ビーズミックスは使用前にボルテックスなどでしっかりと攪拌してください。

- 3) 1)で変性した増幅 DNA に、2)で調製したハイブリミックス:25  $\mu\text{L}$  を加え、シールをした後、ボルテックスで良く攪拌します。シールに付着した反応液はスナッピングでできるだけ反応容器内に落とします。
- 4) \*55°C に設定したサーマルサイクラーに 3)のプレートをセットし、**30 分間**ハイブリダイゼーションを行います。
  - プレート遠心分離機を用い、3,000rpm(約 1,000  $\times$  g)で 1 分間の遠心分離を行います。
  - \*\*\* ■ 溶液が多く残った場合は、5)の操作をもう一度くり返して下さい。
- 5) ⑦洗浄液:\*\*\*75  $\mu\text{L}$  を各ウェルに加え、**1 分間遠心分離**を行います。遠心分離の後、**上清をスナッピングにより除きます**\*\*\*(溶液がほとんど残らないようにして下さい)。
  - \*\*\* ■ 測定前に室温放置すると、非特異反応の原因となりますので、速やかに測定を開始して下さい。
- 6) ⑦洗浄液:75  $\mu\text{L}$  を各ウェルに加えます。
- 7) \*\*\*Luminex XYP のブロック温度が 37°Cであることを確認して、**ビーズミックスの Lot 番号に対応したテンプレートファイル**を使用して測定します。

## 《測定結果の判定法》

測定結果の CSV ファイルを「WAKFlow® Typing Software」で開き、各蛍光ビーズの陽性・陰性を判定表に記載しているカットオフ値をもとに自動判定します。(自動判定では、蛍光強度がカットオフ値以上を示すビーズを陽性、カットオフ値以下を示すビーズを陰性とし、各ビーズの陽性・陰性のパターンから HNA-1 の遺伝子型を決定します。)

- ビーズミックスの Lot 番号に対応していないテンプレートファイルでは判定できませんので注意して下さい。
- 専用の判定ソフトウェア「WAKFlow® Typing Software」は、試薬ご購入の際、無償にて提供いたします。